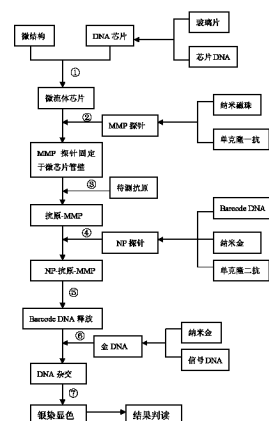




(45) 授權公告日 2013. 07. 03

权利要求书4页 说明书7页
序列表1页 附图2页

本发明涉及一种基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的方法,其特征在于采用标准的光刻工艺实现微结构的制作,用玻璃片(点有DNA探针)与微结构封接制备了所需的微流体芯片;在纳米金颗粒上同时标记单克隆二抗及信号放大作用的Barcode DNA,并在磁珠上标记单克隆一抗;在微流体芯片管道内,通过抗原抗体免疫反应以及信号的逐级放大、银染显色,从而达到对微量目标蛋白的检测。所述的方法将生物样品的富集、分离和检测连接为一体,具有特异、快速和高灵敏的特点,可望应用于临床检验医学中微量蛋白(抗原或抗体)的诊断和检测。灵敏度可达 pg/ml ,比临床中普通的LEISA法提高了1000倍。



1. 基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的方法,其特征在于是通过纳米磁珠和纳米金 DNA 结合微流体芯片技术,将样品混合、反应、分离及检测功能集成一体,通过纳米磁珠标记单克隆一抗,纳米金同时标记单克隆二抗与 Barcode DNA,两者与抗原形成三明治结构,然后通过变性将 Barcode DNA 从三明治结构上的释放出来,并由微芯片的捕获区域流入检测区域,进一步与金 DNA、芯片 DNA 互补杂交,从而造成信号逐级放大,通过银染显色得出结果;

所述的方法包括以下步骤:

(A) 微流体芯片的制备

利用标准的光刻工艺实现微结构的制作,将点有 DNA 的醛基修饰玻璃片与微结构封接制备了所需的微流体芯片;所制作的微流体芯片具有将生物样品的富集、分离和检测连接为一体,应用于微量蛋白质抗原或抗体的检测;制备过程如下:

a) 硅片为基底材料,用 SU-8 光刻胶,曝光、显影制作管道模具和阀门模具;

b) 将 PDMS、固化剂以质量比为 20:1 比例混合,除气泡后浇注在管道模具上,90℃ 加热固化 1 小时,制作管道微结构;

c) 将 PDMS、固化剂以质量比为 10:1 比例混合,除气泡后浇注在阀门模具上,90℃ 加热固化 1 小时,制作阀门微结构;

d) 剥离阀门模具上的 PDMS,用打孔针打 A、B、C 三个进气孔;然后与管道微结构贴合在一起;

e) 然后剥离管道-阀门粘合体,打进样孔和废液池孔,并与点有 DNA 的玻璃片键合,完成微芯片的制作;

(B) 检测试剂及 DNA 的设计

a) 纳米金溶液的制备

配置浓度为 1mM 四氯金酸溶液及浓度为 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液,将四氯金酸溶液加热至 120-140℃,加热过程中搅拌充分,20 分钟时迅速加入新配好的柠檬酸三钠溶液 25ml,持续搅拌至溶液冷却至室温、即形成为酒红色溶液;以 0.22 μm 硝酸纤维尼龙膜过滤溶液,即可得到颗粒均匀的 13nm 纳米金溶液,4℃ 保存备用;

b) DNA 链的设计及合成

设计了三条 DNA 探针,一条是 Barcode DNA,用于标记单克隆二抗,起信号放大作用,同时连接到纳米金颗粒上;第二条是信号 DNA,用于标记纳米金,与 Barcode DNA 一部分序列杂交互补反应,起信号放大作用;第三条是芯片 DNA,固定于醛基修饰的玻璃片上,并且与 Barcode DNA 另一部分序列杂交互补反应;

(C) 单克隆抗体和 DNA 的标记

a) 纳米磁珠标记单克隆一抗-mMP 探针

将 50 μl 纳米磁珠用等量 MES 清洗,去上清,依次加入 50 μl EDC 和 NHS,孵育后去上清、清洗;将活化好的磁珠溶于 90 μl 的 MES,与 5 μl 单克隆一抗混合均匀后孵育;然后加入 100 μl Tris 孵育,磁分离后用 100 μl 的磷酸盐缓冲液,10mM 清洗,去上清,加入 50 μl 的 10mM 磷酸盐缓冲液重新悬浮磁珠,4℃ 保存;

mMP 探针用于捕获待检测的微量抗原,由于抗原抗体反应形成 mMP-抗原复合物;

其中,① MES 为 2-(N-吗啉)乙磺酸,25mM, pH6;

② EDC 为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐；

③ NHS 为 N-羟基琥珀酰亚胺；

b) 单克隆二抗、barcode DNA 标记纳米金 -NP 探针

取 200 μ l 的纳米金,用碳酸钾调节 PH 为 8.2,加入 30 μ l 的单克隆二抗,放置 1 个小时后,再加入 3 μ l barcode DNA,孵育 24 小时;加 5 μ l 的 10%PEG8000 孵育 30min 后,依次加入 4 μ l 的 0.1M NaCl、0.01M PB,使溶液维持一定盐浓度,4℃保存;PB 为磷酸氢二钠的缩写;

NP 探针可与 MMP-抗原复合物反应,形成三明治结构,信号初次放大;

c) 信号 DNA 与纳米金构筑成金 -DNA

取 1ml 纳米金溶液 4℃、9000rpm 离心 50min,弃上清,加入 97 μ l 灭菌水和 3 μ l 信号 DNA 到金颗粒中,混合均匀后,4℃静置 12 小时;然后依次加入 3 μ l 的 0.1M PB、1M NaCl,总体积为 18 μ l,每次 1 小时,共三次;混合均匀后,4℃静置 48 小时,再加入 PB/NaCl 混合液使总体积为 1ml;离心 50min 后,弃上清,加入 100 μ l 的 PB/NaCl 混合液,4℃保存;所述 PB/NaCl 混合液为 0.01M PB、0.1M NaCl;

金 -DNA 与 Barcode DNA 杂交反应,信号再次放大;

(D) 检测与结果判读

a) 取 10 μ l 的乙肝表面抗原加入微流体芯片的进样口(1),与 MMP 探针室温孵育 30 分钟,抗原抗体免疫反应形成了抗原-MMP 复合物;磁场作用下,用 30 μ l 的 10mM PBS 磷酸盐、pH7.4 清洗,将未反应的多余抗原冲洗掉,废液从废液池(2)流走,阀门 B、C 处于关闭状态;

b) 加入 20 μ l 的 NP 探针,孵育 30 分钟,形成了三明治结构 NP-抗原-MMP,信号通过 NP 探针上 Barcode DNA 初次放大;磁场作用下,用 30 μ l 的 10mM 磷酸盐缓冲液清洗,将未反应的 NP 探针冲洗掉,废液从废液池(2)流走,此时阀门 B、C 处于关闭状态;

c) 去磁场,加入 20 μ l DTT,变性 15min;打开阀门 B,使释放的 Barcode DNA 流入检测区域,与微流体芯片上 DNA 杂交;

d) 同时将 20 μ l 金 DNA 加入进样口(3),形成金 DNA-Barcode DNA-DNA 芯片杂交复合物,信号通过金 DNA 再次放大,孵育 15min 后,加入银染试剂,5min 后观察结果;

e) 当银离子遇到 DNA-Barcode DNA-金-DNA 复合物时,纳米金将银离子还原为银颗粒,使银颗粒沉积放大,通过肉眼或显微镜观察可见黑褐色颗粒。

2. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于:

a) 步骤 A 所述的微流体芯片分为捕获区域和检测区域,芯片尺寸为 75mm $\times$ 25mm;

b) 步骤 A 步骤 a) 中阀门的宽度是管道宽度的 1.5 倍;

c) 步骤 B 中步骤 b) 中涉及的四条 DNA 探针的序列分别为

Barcode DNA :5'-GTGCCTTGGGTGGCTTTG-PEG9mer-AGCTACGAATAA-(CH₂)₃-SH-3'

信号 DNA :5'-HS-(CH₂)₃-Poly(A)₁₀-TTA TTC GTA GCT-3'

芯片 DNA :5'-NH₂-poly(A)₁₆-CAAAGCCACCCAAGGCAC-3'

d) 步骤(C)步骤 a) 中磁珠的用量为 500 μ g,抗体的用量为 5 μ g;

e) 步骤(C)步骤 b) 中纳米金颗粒大小为 13nm,纳米金溶液浓度为 12.2nM,单克隆二抗的浓度为 0.1mg/ml.;

f) 所述步骤(C)步骤 c) 中信号 DNA 的浓度为 300pM。

3. 按权利要求1所述的方法,其特征在于对于乙肝表面抗原检测步骤是:(A)微流体芯片的制备

①、硅片为基底材料,用 SU-8 光刻胶,曝光、显影制作管道模具和阀门模具;

②、将 PDMS、固化剂以质量比为 20 :1 比例混合、除气泡后浇注在管道模具上,90℃加热固化 1 小时,制作管道微结构;

③、将 PDMS、固化剂以质量比为 10 :1 比例混合、除气泡后浇注在阀门模具上,90℃加热固化 1 小时,制作阀门微结构;

④、剥离阀门模具上的 PDMS,用打孔针打 A、B、C 三个进气孔;然后与管道微结构贴合在一起;

⑤、然后剥离管道-阀门粘合体,打 2 个进样孔和 2 个废液池孔,并与点有 DNA 的玻璃片键合,完成微芯片的制作;

(B) 检测试剂及 DNA 的准备

a) 纳米金溶液的制备

配置浓度为 1mM 四氯金酸溶液及浓度为 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液;将四氯金酸溶液加热至 130℃,且加热过程中搅拌充分,20 分钟时迅速加入新配好的柠檬酸三钠溶液 25ml,持续搅拌至溶液冷却至室温,即形成酒红色溶液;以 0.22 μm 硝酸纤维尼龙膜过滤溶液,即可得到颗粒均匀的 13nm 纳米金溶液,4℃保存备用;

b) DNA 链的设计及合成

设计了三条 DNA 探针,一条是 Barcode DNA,用于标记单克隆二抗,起信号放大作用;第二条是信号 DNA,用于标记纳米金,与 Barcode DNA 一部分序列杂交互补反应,起信号放大作用;第三条是芯片 DNA,固定于醛基修饰的玻璃片上,与 Barcode DNA 另一部分序列杂交互补反应,并进行 DNA 探针的合成;

(C) 单克隆抗体和 DNA 的标记

a) 纳米磁珠标记单克隆一抗-MMP 探针

将 50 μl 纳米磁珠用等量 MES 清洗,去上清,依次加入 50 μl EDC 和 NHS,孵育后去上清、清洗;将活化好的磁珠溶于 90 μl 的 MES,与 5 μl 单克隆一抗混合均匀后孵育;然后加入 100 μl Tris 孵育,磁分离后用 100 μl 的 PBS 清洗,去上清,加入 50 μl 的 PBS 重新悬浮纳米磁珠,4℃保存;MMP 探针用于捕获待检测的微量抗原,由于抗原抗体反应形成 MMP-抗原复合物;

b) 单克隆二抗、barcode DNA 标记纳米金-NP 探针

取 200 μl 的纳米金,用碳酸钾调节 pH 为 8.2 附近,加入 30 μl 的单克隆二抗,放置 1 个小时后,再加入 3 μl barcode DNA,孵育 24 小时;加 5 μl 的 10%PEG8000 孵育 30min 后,依次加入 4 μl 的 0.1M NaCl、0.01M PB,加三次,使溶液维持一定盐浓度,4℃保存;NP 探针可以与 MMP-抗原复合物反应,形成三明治结构,信号初次放大;

c) 信号 DNA 与纳米金,即金-DNA 探针

取 1ml 纳米金溶液 4℃、9000rpm 离心 50min,弃上清,加入 97 μl 灭菌水和 3 μl 信号 DNA 到金颗粒中,混合均匀后,4℃静置 12 小时;然后依次加入 3 μl 的 0.1M PB、1M NaCl,总体积为 18 μl ,每次 1 小时,共三次;混合均匀后,4℃静置 48 小时,再加入 PB/NaCl 混合液使总体积为 1ml;离心 50min 后,弃上清,加入 100 μl 的 PB/NaCl 混合液,4℃保存;

金 DNA 可与 Barcode DNA 杂交反应,信号再次放大;

(D) 检测与结果

a) 取 $10\ \mu\text{L}$ 的乙肝表面抗原加入微芯片的进样口(1),与 MMP 探针室温孵育 30 分钟,抗原抗体免疫反应形成了抗原-MMP 复合物;在磁场作用下,用 $30\ \mu\text{L}$ 的 10mM PBS 磷酸盐、 $\text{pH}7.4$ 清洗,将未反应的多余抗原冲洗掉,废液从废液池(2)流走,此时阀门 B、C 处于关闭状态;

b) 加入 $20\ \mu\text{L}$ 的 NP 探针,孵育 30 分钟,形成了三明治结构 NP-抗原-MMP,信号通过 NP 探针上 Barcode DNA 初次放大;在磁场作用下,用 $30\ \mu\text{L}$ 的 10mM PBS 磷酸盐, $\text{pH}7.4$ 清洗,将未反应的 NP 探针冲洗掉,废液从废液池 2 流走,此时阀门 B、C 处于关闭状态;

c) 去磁场,加入 $20\ \mu\text{L}$ DTT,变性 15min;打开阀门 B,使释放的 Barcode DNA 流入检测区域,与微芯片上 DNA 杂交;

d) 同时将 $20\ \mu\text{L}$ 金-DNA 加入进样口(3),形成金 DNA-Barcode DNA-DNA 芯片杂交复合物,信号通过金 DNA 再次放大,孵育 15min 后,加入银染试剂,5min 后观察结果;结果是抗原与磁珠上抗体结合,然后与 NP 探针形成三明治结构,通过 Barcode DNA 释放到检测区域,与互补芯片 DNA、金-DNA 杂交,银染显色。

4. 按权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于临床乙肝血清标本检测步骤与权利要求 2 或 4 中 A、B、C 步骤相同,只是样品处理时将临床血清样品用小牛血清稀释,取浓度为 1pg/ml 、 10pg/ml 、 100pg/ml ,各取 $10\ \mu\text{L}$ 加入进样口中。

5. 按权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其特征在于所述方法的灵敏度可达 pg/ml ,比临床中普通的 ELISA 法高了 1000 倍。

基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微量蛋白的检测领域,特别涉及基于纳米探针结合微流体芯片技术来检测目标蛋白的方法。

背景技术

[0002] 我国是病毒性肝炎发病率较高的国家,乙型肝炎 (HBV) 的发病率均居世界首位。慢性感染可致肝脏慢性炎症坏死和纤维化,部分患者可发展为肝硬化甚至肝细胞癌 (HCC), 对患者的健康和生命危害极大,已成为严重的社会和公共卫生问题。因此早期及时有效地对患者进行肝炎病毒的检测就显得尤为重要。目前临床诊断 HBV 主要方法有 ELISA 和聚合酶链反应,但仍存在一定的局限性。前者的窗口期漏检是当前影响血液安全性进一步提高的瓶颈,后者由于交叉污染而带来的假阳性问题。不同的检测方法针对同一种病原有不同的窗口期,酶免检测的窗口期比较长,而 HBsAg 则为 56 天。处于窗口期的病人具有传染性,但用这种检测方法无法检测到其病毒标志物,这一原因占血液漏检的 90% 以上。故酶免检测的窗口期漏检几乎不可避免。为了大幅度地缩短检测窗口期,进一步提高血液安全性,因此如何建立一种简单、快速、特异的乙型肝炎微量蛋白检测方法非常关键。

[0003] 近年来,纳米材料的优良特性受到人们越来越多地关注,如在免疫检测中受到广泛应用的纳米级的胶体金颗粒,由于纳米金颗粒对蛋白质有很强的吸附功能,可以与蛋白质 / 核酸等非共价结合,因而在生物学基础研究和临床实验中成为非常有用的工具。纳米金颗粒具有高电子密度的特性,在金标蛋白结合处,在显微镜下可见黑褐色颗粒,当这些标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色斑点,因而广泛应用于定性或半定量的快速检测方法中,这一反应也可以通过银颗粒的沉积被放大,称之为银染色。纳米金颗粒标记技术具有简单、快速、准确和无污染等优点,且检测不依赖昂贵的激光检测仪器,只需普通光学仪器,甚至肉眼即可辨别。

[0004] 目前,将纳米技术应用到临床医学中微量蛋白质的检测已成为热点。现已有报道,如纳米金结合辣根过氧化物酶检测肿瘤蛋白、纳米金结合荧光染料对核蛋白的检测等方法,但这些方法都存在一定的缺陷,前者需要特定的酶标仪,而后者需要荧光试剂及昂贵的荧光检测仪,容易造成污染、假阳性。因此,需要建立一种无需特殊仪器仅靠肉眼观察的纳米检测微量蛋白质的方法。

[0005] 基于以上所述,本发明拟将纳米技术、微流控技术、银染技术结合起来,建立一种基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的方法,并将此方法用于乙型肝炎微量蛋白的检测,因而引导出本发明的主要构思。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的方法,针对在临床血清中乙型肝炎的诊断。

[0007] 本发明是通过纳米磁珠和纳米金 DNA 结合微流体芯片技术,将样品混合、反应、分

离及检测功能集成一体,在纳米金颗粒上同时标记单克隆二抗及信号放大作用的 Barcode DNA,通过信号的逐级放大,达到对微量目标抗原的检测。该方法具有高灵敏度和特异性,并且不需要复杂的仪器以及酶反应的 PCR 实验条件,有望应用于临床检验医学中乙型肝炎的早期检测和筛查。

[0008] 具体的说本发明是由微流体芯片的制备、检测试剂及 DNA 的准备、单克隆抗体和 DNA 的标记、检测与结果判读等四个过程组成的,主要通过纳米磁珠标记单克隆一抗,纳米金同时标记单克隆二抗与 Barcode DNA,两者与抗原形成三明治结构,然后通过变性将 Barcode DNA 从三明治结构上的释放出来,并由微芯片的捕获区域流入检测区域,进一步与金 DNA、芯片 DNA 互补杂交,从而造成信号逐级放大,通过银染显色得出结果(流程见图 1)。具体技术方案阐述如下:

[0009] (一) 微流体芯片的制备

[0010] 微流体芯片(简称微芯片)中微结构的示意图如图 2 所示。利用标准的光刻工艺实现微结构的制作,将点有 DNA 的醛基修饰玻璃片与微结构封接制备了所需的微芯片。该芯片具有将生物样品的富集、分离和检测连接为一体,应用于微量蛋白质(抗原或抗体)的检测。整个芯片大小为 $75\text{mm} \times 25\text{mm}$,分为捕获区域和检测区域,制备过程如下:

[0011] 1、硅片为基底材料,甩 SU-8 光刻胶,曝光、显影制作管道模具和阀门模具;

[0012] 2、将 PDMS、固化剂以 20 : 1 混合(重量比),除气泡后浇注在管道模具上,90℃ 加热固化 1 小时,制作管道微结构;

[0013] 3、将 PDMS、固化剂以 10 : 1 混合(重量比),除气泡后浇注在阀门模具上,90℃ 加热固化 1 小时,制作阀门微结构;

[0014] 4、剥离阀门模具上的 PDMS,用打孔针打进气孔(图 2 中 A、B、C 三个孔);然后与管道微结构贴合在一起;

[0015] 5、然后剥离管道-阀门粘合体,打孔(图 2 中 1、3 为进样孔,2、4 为废液池),并与点有 DNA 的玻璃片键合,完成微芯片的制作。

[0016] 所述步骤(一)/1 中阀门(包括阀门 A、阀门 B、阀门 C)的宽度是管道宽度的 1.5 倍;

[0017] 所述步骤(一)/2 中管道微结构中 PDMS 单体与固化剂的重量混合比例 20 : 1;

[0018] 所述步骤(一)/3 中阀门微结构中 PDMS 单体与固化剂的重量混合比例 10 : 1;

[0019] 所述步骤(一)/2、3 中管道与阀门微结构的固化条件是 90℃,1 小时;

[0020] (二) 检测试剂及 DNA 的设计

[0021] 1、纳米金溶液的制备

[0022] 配置浓度为 1mM HAuCl_4 (四氯金酸)溶液及浓度为 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液。将 HAuCl_4 溶液加热至 120-140℃;保证加热过程中搅拌充分,约 20 分钟时迅速加入新配好的柠檬酸三钠溶液(此过程中注意保温,不要让 HAuCl_4 溶液降温)25ml,持续搅拌至溶液冷却至室温、即形成酒红色溶液。以 0.22 μm 硝酸纤维尼龙膜过滤溶液,即可得到颗粒均匀的 13nm 纳米金溶液,4℃ 保存备用。

[0023] 2、DNA 链的设计及合成

[0024] 设计了三条 DNA 探针,一条是 Barcode DNA,用于标记单克隆二抗,起信号放大作用;第二条是信号 DNA,用于标记纳米金,与 Barcode DNA 一部分序列杂交互补反应,起信号

放大作用；第三条是芯片 DNA，固定于醛基修饰的玻璃片上，与 Barcode DNA 另一部分序列杂交互补反应。DNA 探针的合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成，序列如下，

[0025] Barcode DNA :5' -GTGCCTTGGGTGGCTTTG-PEG9mer-AGCTACGAATAA-(CH₂)₃-SH-3'

[0026] 信号 DNA :5' -HS-(CH₂)₃-Poly(A)₁₀-TTA TTC GTA GCT-3'

[0027] 芯片 DNA :5' -NH₂-poly(A)₁₆-CAAAGCCACCCAAGGCAC-3

[0028] (三) 单克隆抗体和 DNA 的标记

[0029] 1、纳米磁珠标记单克隆一抗 (MMP 探针)

[0030] 将 50ul 纳米磁珠 (Dyna Invitrogen Corp. (USA)) 用等量 MES (2-(N- 吗啉) 乙磺酸, 25Mm, PH6) 清洗, 去上清, 依次加入 50ul EDC (1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐) 和 NHS (N- 羟基琥珀酰亚胺), 孵育后去上清、清洗; 将活化好的磁珠溶于 90ul 的 MES, 与 5ul 单克隆一抗混合均匀后孵育; 然后加入 100ul Tris 孵育, 磁分离后用 100ul 的 PBS (磷酸盐缓冲液, 10mM) 清洗, 去上清, 加入 50ul 的 PBS 重新悬浮磁珠, 4℃ 保存。

[0031] MMP 探针用于捕获待检测的微量抗原, 由于抗原抗体反应形成 MMP- 抗原复合物。

[0032] 2、单克隆二抗、barcode DNA 标记纳米金 (NP 探针)

[0033] 取 200ul 的纳米金, 用碳酸钾调节 PH 为 8.2 附近, 加入 30ul 的单克隆二抗, 放置 1 个小时后, 再加入 3ul barcode DNA, 孵育 24 小时; 加 5ul 的 10% PEG8000 (聚乙二醇 8000) 孵育 30min 后, 依次加入 4ul 的 0.1M NaCl、0.01M PB (磷酸氢二钠或磷酸二氢钠), 加三次, 使溶液维持一定盐浓度, 4℃ 保存。

[0034] NP 探针可以与 MMP- 抗原复合物反应, 形成三明治结构, 信号初次放大。

[0035] 3、信号 DNA 与纳米金 (金 DNA)

[0036] 取 1ml 纳米金溶液 4℃、9000rpm 离心 50min, 弃上清, 加入 97 μl 灭菌水和 3 μl 信号 DNA 到金颗粒中, 混合均匀后, 4℃ 静置 12 小时; 然后依次加入 3 μl 的 0.1M PB、1M NaCl, 总体积为 18 μl (1 小时 / 次, 三次); 混合均匀后, 4℃ 静置 48 小时, 再加入 PB/NaCl 混合液 (0.01M PB、0.1M NaCl) 使总体积为 1ml; 离心 50min 后, 弃上清, 加入 100ul 的 PB/NaCl 混合液, 4℃ 保存。

[0037] 金 DNA 可与 Barcode DNA 杂交反应, 信号再次放大。

[0038] 所述步骤 (三)/1 中磁珠的用量为 500 μg, 抗体的用量为 5 μg;

[0039] 所述步骤 (三)/2 中纳米金颗粒大小为 13nm, 纳米金溶液浓度为 12.2nM, 单克隆二抗的浓度为 0.1mg/ml.;

[0040] 所述步骤 (三)/3 中信号 DNA 的浓度为 300PM;

[0041] (四) 检测与结果判读

[0042] 1、取 10 μl 的乙肝表面抗原加入微芯片的进样口 1, 与 MMP 探针室温孵育 30 分钟, 抗原抗体免疫反应形成了抗原-MMP 复合物; 磁场作用下, 用 30 μl 的 10mM PBS 磷酸盐、PH7.4 清洗, 将未反应的多余抗原冲洗掉, 废液从废液池 2 流走 (阀门 B、C 处于关闭状态)。

[0043] 2、加入 20 μl 的 NP 探针, 孵育 30 分钟, 形成了三明治结构 NP- 抗原-MMP, 信号通过 NP 探针上 Barcode DNA 初次放大; 磁场作用下, 用 30 μl 的 10mMPBS 磷酸盐清洗, 将未反应的 NP 探针冲洗掉, 废液从废液池 2 流走 (阀门 B、C 处于关闭状态)。

[0044] 3、去磁场, 加入 20 μl DTT, 变性 15min。打开阀门 B, 使释放的 BarcodeDNA 流入检测区域, 与微芯片上 DNA 杂交。

[0045] 4、同时将 $20\ \mu\text{L}$ 金 DNA 加入进样口 3, 形成金 DNA-Barcode DNA-DNA 芯片杂交复合物, 信号通过金 DNA 再次放大, 孵育 15min 后, 加入银染试剂, 5min 后观察结果。当银离子遇到 DNA-Barcode DNA-金 DNA 复合物时, 由于纳米金将银离子还原为银颗粒, 造成银颗粒的沉积放大, 通过肉眼或显微镜观察可见黑褐色颗粒。

[0046] 综上所述, 本发明涉及一种基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的方法, 其特征在于采用标准的光刻工艺实现微结构的制作, 用玻璃片 (点有 DNA 探针) 与微结构封接制备了所需的微流体芯片; 在纳米金颗粒上同时标记单克隆二抗及信号放大作用的 Barcode DNA, 并在磁珠上标记单克隆一抗; 在微流体芯片管道内, 通过抗原抗体免疫反应以及信号的逐级放大、银染显色, 从而达到对微量目标蛋白的检测。所述的方法将生物样品的富集、分离和检测连接为一体, 具有特异、快速和高灵敏的特点, 可望应用于临床检验医学中微量蛋白 (抗原或抗体) 的诊断和检测。灵敏度可达 pg/ml , 比临床中普通的 LEISA 法提高了 1000 倍。

附图说明

[0047] 图 1 为基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的流程图;

[0048] 图 2 为微流体芯片的结构示意图;

[0049] 图 3 为乙肝表面抗原 (a) 和小牛血清 (b) 的检测结果;

[0050] 图 4 为临场血清样本的检测结果, (a) 稀释 1000 倍, (b) 稀释 100 倍, (c) 稀释 10 倍。

具体实施方式

[0051] 下面通过附图说明和具体实施例的解释, 以进一步阐述本发明的实质性特点和显著的进步。

[0052] 图 1 为本发明提供的检测微量蛋白的流程图, 图中①微结构与 DNA 芯片封接构成了微流体芯片, 简称微芯片;

[0053] ②将 MMP 探针加入微芯片进样孔 1 中, 在磁场作用下, 固定于微管壁;

[0054] ③加入待测抗原 (进样孔 1), 与 MMP 探针抗原抗体反应, 缓冲液冲洗;

[0055] ④加入 NP 探针 (进样孔 1), 与抗原-MMP 形成三明治结构 NP-抗原-MMP;

[0056] ⑤加入 DTT (进样孔 1) 孵育后, 打开阀门 B, Barcode DNA 释放到微芯片的检测区域;

[0057] ⑥同时在进样孔 3 中加入金 DNA, 形成金 DNA-Barcode DNA-DNA 芯片复合物;

[0058] ⑦加入银染试剂显色, 由于银离子被纳米金氧化还原为银粒子, 从而造成银沉积显黑褐色;

[0059] 上述步骤 1、2、3、4 中阀门 B 和阀门 C 处于关闭状态; 步骤 6、7 中阀门 A 和阀门 B 处于关闭状态。

[0060] 图 2 为微流体芯片的结构示意图, 微流体使用是 1) 将阀门 PDMS 模型作好后, 打阀门 A、B、C 的进气孔;

[0061] 2) 将阀门与管道 PDMS 粘合后, 打进样孔 1、3, 废液池 2、4;

[0062] 3) 当反应在捕获区域时, 通过气压来控制阀门 B、阀门 C 处于关闭状态;

[0063] 4) 当反应在检测区域时,通过气压来控制阀门 B、阀门 A 处于关闭状态。

[0064] 实施例 1 :标准品乙肝表面抗原的检测

[0065] (一) 微流体芯片的制备

[0066] 1、硅片为基底材料,甩 SU-8 光刻胶,曝光、显影制作管道模具和阀门模具 ;

[0067] 2、将 PDMS、固化剂以 20 : 1 混合 (重量比)、除气泡后浇注在管道模具上,90℃ 加热固化 1 小时,制作管道微结构 ;

[0068] 3、将 PDMS、固化剂以 10 : 1 混合 (重量比)、除气泡后浇注在阀门模具上,90℃ 加热固化 1 小时,制作阀门微结构 ;

[0069] 4、剥离阀门模具上的 PDMS,用打孔针打进气孔 (图 2 中 A、B、C 三个孔) ;然后与管道微结构贴合在一起 ;

[0070] 5、然后剥离管道 - 阀门粘合体,打孔 (图 2 中 1、3 为进样孔,2、4 为废液池),并与点有 DNA 的玻璃片键合,完成微芯片的制作。

[0071] (二) 检测试剂及 DNA 的准备

[0072] 1、纳米金溶液的制备

[0073] 配置浓度为 1mM HAuCl₄ (四氯金酸) 溶液及浓度为 38.8mM 的,柠檬酸三钠溶液。将 HAuCl₄ 溶液加热至 130℃,保证加热过程中搅拌充分,约 20 分钟时迅速加入新配好的柠檬酸三钠溶液 (此过程中注意保温,不要让 HAuCl₄ 溶液降温) 25ml,持续搅拌至溶液冷却至室温、即形成酒红色溶液。以 0.22 μm 硝酸纤维尼龙膜过滤溶液,即可得到颗粒均匀的 13nm 纳米金溶液,4℃ 保存备用。

[0074] 2、DNA 链的设计及合成

[0075] 设计了三条 DNA 探针,一条是 Barcode DNA,用于标记单克隆二抗,起信号放大作用 ;第二条是信号 DNA,用于标记纳米金,与 Barcode DNA 一部分序列杂交互补反应,起信号放大作用 ;第三条是芯片 DNA,固定于醛基修饰的玻璃片上,与 Barcode DNA 另一部分序列杂交互补反应。DNA 探针的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成,序列如下,

[0076] Barcode DNA :5' -GTGCCTTGGGTGGCTTTG-PEG9mer-AGCTACGAATAA-(CH₂)₃-SH-3'

[0077] 信号 DNA :5' -HS-(CH₂)₃-Poly(A)10-TTA TTC GTA GCT-3'

[0078] 芯片 DNA :5' -NH₂-poly(A)16-CAAAGCCACCCAAGGCAC-3

[0079] (三) 单克隆抗体和 DNA 的标记

[0080] 1、纳米磁珠标记单克隆一抗 (MMP 探针)

[0081] 将 50ul 纳米磁珠 (DynaI Invitrogen Corp. (USA)) 用等量 MES (2-(N- 吗啉) 乙磺酸, 25Mm, PH6) 清洗,去上清,依次加入 50ul EDC (1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐) 和 NHS (N- 羟基琥珀酰亚胺),孵育后去上清、清洗 ;将活化好的磁珠溶于 90ul 的 MES,与 5ul 单克隆一抗混合均匀后孵育 ;然后加入 100ul Tris 孵育,磁分离后用 100ul 的 PBS (磷酸盐缓冲液,10mM) 清洗,去上清,加入 50ul 的 PBS 重新悬浮纳米磁珠,4℃ 保存。

[0082] MMP 探针用于捕获待检测的微量抗原,由于抗原抗体反应形成 MMP- 抗原复合物。

[0083] 2、单克隆二抗、barcode DNA 标记纳米金 (NP 探针)

[0084] 取 200ul 的纳米金,用碳酸钾调节 PH 为 8.2 附近,加入 30ul 的单克隆二抗,放置 1 个小时后,再加入 3ul barcode DNA,孵育 24 小时 ;加 5ul 的 10% PEG8000 (聚乙二醇 8000) 孵育 30min 后,依次加入 4ul 的 0.1M NaCl、0.01M PB (磷酸氢二钠或磷酸二氢钠),加三次,

使溶液维持一定盐浓度,4℃保存。

[0085] NP 探针可以与 MMP- 抗原复合物反应,形成三明治结构,信号初次放大。

[0086] 3、信号 DNA 与纳米金 (金 DNA 探针)

[0087] 取 1ml 纳米金溶液 4℃、9000rpm 离心 50min,弃上清,加入 97 μ l 灭菌水和 3 μ l 信号 DNA 到金颗粒中,混合均匀后,4℃静置 12 小时;然后依次加入 3 μ l 的 0.1M PB、1M NaCl,总体积为 18 μ l (1 小时 / 次,三次);混合均匀后,4℃静置 48 小时,再加入 PB/NaCl 混合液 (0.01M PB、0.1M NaCl) 使总体积为 1ml;离心 50min 后,弃上清,加入 100 μ l 的 PB/NaCl 混合液,4℃保存。

[0088] 金 DNA 可与 Barcode DNA 杂交反应,信号再次放大。

[0089] (四) 检测与结果判读

[0090] 1、取 10 μ l 的乙肝表面抗原加入微芯片的进样口 1,与 MMP 探针室温孵育 30 分钟,抗原抗体免疫反应形成了抗原-MMP 复合物;在磁场作用下,用 30 μ l 的 10mM PBS 磷酸盐、PH7.4 清洗,将未反应的多余抗原冲洗掉,废液从废液池 2 流走 (阀门 B、C 处于关闭状态)。

[0091] 2、加入 20 μ l 的 NP 探针,孵育 30 分钟,形成了三明治结构 NP- 抗原-MMP,信号通过 NP 探针上 Barcode DNA 初次放大;在磁场作用下,用 30 μ l 的 10mM PBS 磷酸盐清洗,将未反应的 NP 探针冲洗掉,废液从废液池 2 流走 (阀门 B、C 处于关闭状态)。

[0092] 3、去磁场,加入 20 μ l DTT,变性 15min。打开阀门 B,使释放的 Barcode DNA 流入检测区域,与微芯片上 DNA 杂交。

[0093] 4、同时将 20 μ l 金 DNA 加入进样口 3,形成金 DNA-Barcode DNA-DNA 芯片杂交复合物,信号通过金 DNA 再次放大,孵育 15min 后,加入银染试剂,5min 后观察结果。

[0094] 结果判读,抗原与磁珠上抗体结合,然后与 NP 探针形成三明治结构,通过 Barcode DNA 释放,与芯片 DNA、金-DNA 杂交,银染显色。见图 3。

[0095] 本发明对比了标准品乙肝表面抗原与标准品小牛血清的对照结果,由于 MMP 抗体可以捕获到乙肝表面抗原,并于 NP 探针形成三明治结构,从而 Barcode DNA 的释放,进一步与芯片 DNA、金 DNA 杂交反应,通过银染可以显示出黑褐色 (见图 3-a);而标准品小牛血清中不含靶抗原,不会形成三明治结构及 Barcode DNA 的释放,也没有杂交反应,银染显示无黑褐色出现 (见图 3-b)。

[0096] 实施例 2:临床血清样品检测 (1ng/ml 乙肝血清标本)

[0097] (一) 微流体芯片的制备

[0098] 与实施案例 1 中 (一) 相同。

[0099] (二) 检测试剂及 DNA 的准备

[0100] 与实施案例 1 中 (二) 相同。

[0101] (三) 单克隆抗体和 DNA 的标记

[0102] 与实施案例 1 中 (三) 相同。

[0103] (四) 检测与结果判读

[0104] 1、样品的处理

[0105] 将临床血清样品用小牛血清稀释,浓度为 1pg/ml、10pg/ml、100pg/ml,取 10 μ l 加入进样口 1。

[0106] 2、方法与实施案例 1 中 (四) 相同,结果见图 4。

[0107] 本发明将临床血清样本稀释了 1000、100、10 倍做灵敏度试验,由于 MMP 抗体可以捕获到临床血清样本中乙肝表面抗原,并于 NP 探针形成三明治结构,从而 Barcode DNA 的释放,进一步与芯片 DNA、金 DNA 杂交反应,通过银染可以显示出黑褐色。如图 4-a 为稀释 1000 倍的血清 (1pg/ml),图 4-b 稀释 100 倍的血清 (10pg/ml),图 4-c 稀释 10 倍的血清 (100pg/ml)。因此,本方法的灵敏度可达到 1pg/ml,比普通方法高了 1000 倍。

[0108] 通过对临床血清样品的检测,发现纳米金结合微流体方法的灵敏度可达 pg/ml,比临床中普通的 ELISA 法高了 1000 倍。

[0001]

序列表

Barcode DNA: 5'-GTGCCTTGGGTGGCTTTG-PEG9mer-AGCTACGAA TAA-(CH₂)₃-SH-3'

信 号 DNA: 5'-HS-(CH₂)₃-Poly(A)₁₀-TTA TTC GTA GCT-3'

芯 片 DNA: 5'-NH₂- poly(A)₁₆-CAAAGCCACCCAAGGCAC-3

这三段 DNA 序列选自 HBV genotype C DNA, 全基因组 (GenBank: AB540584.1), 从 1861bp 到 2040bp。

5'- tgttcaagcc tccaagctgt gccttgggtg gctttggggc atggacattg acccgataa
agaatttgga gcttctgtgg agttactetc ttttttgcct tetgacttet ttccttccat
tcgagatetc ctgcacaccg cctctgctct gtatcgggag gccttagagt ctccggaaca-3'

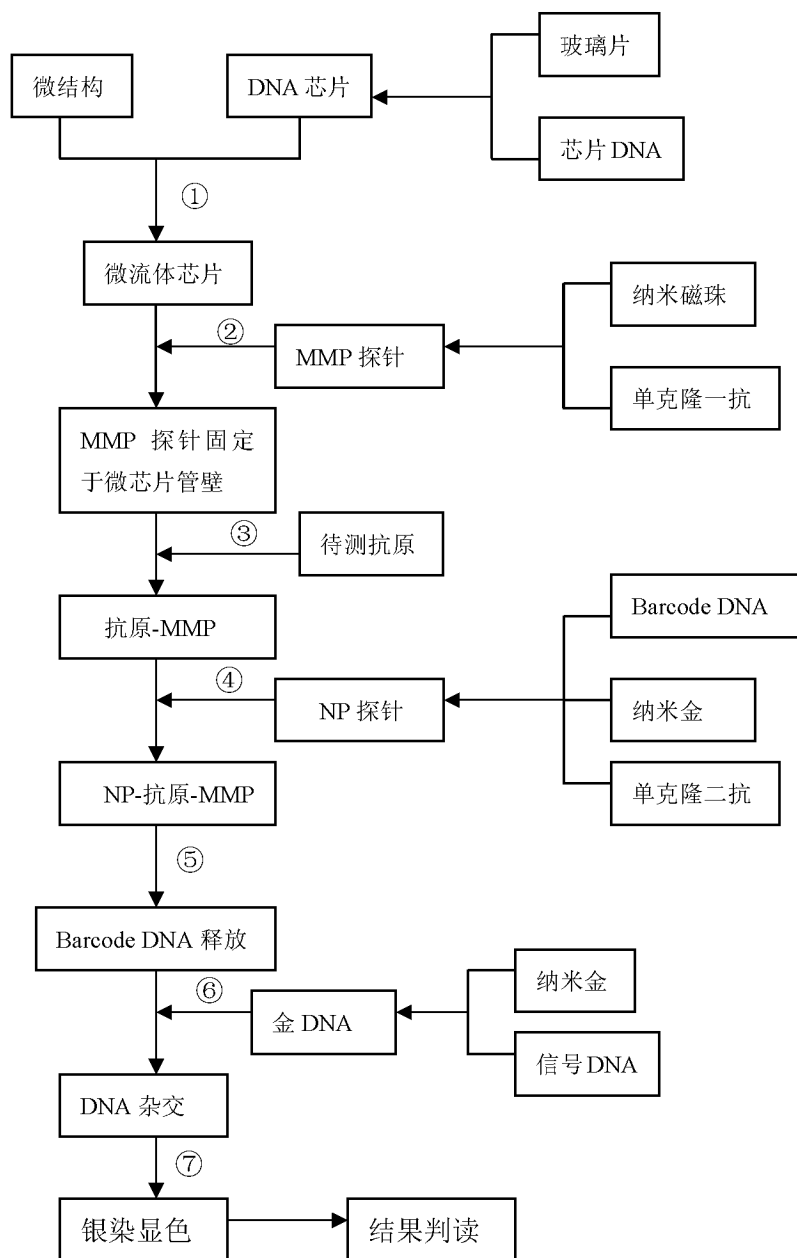


图 1

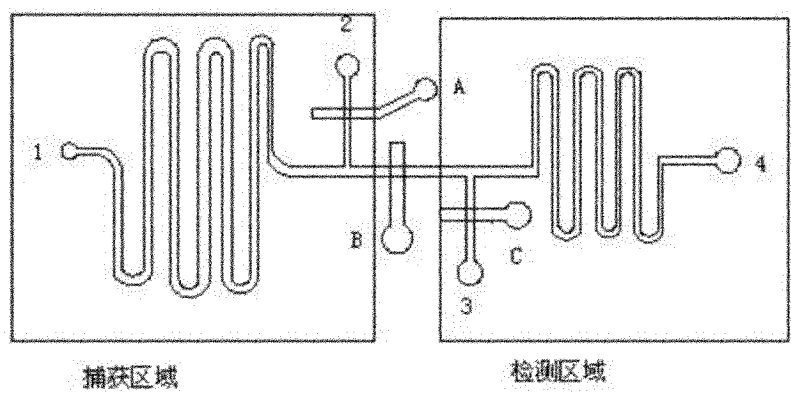


图 2

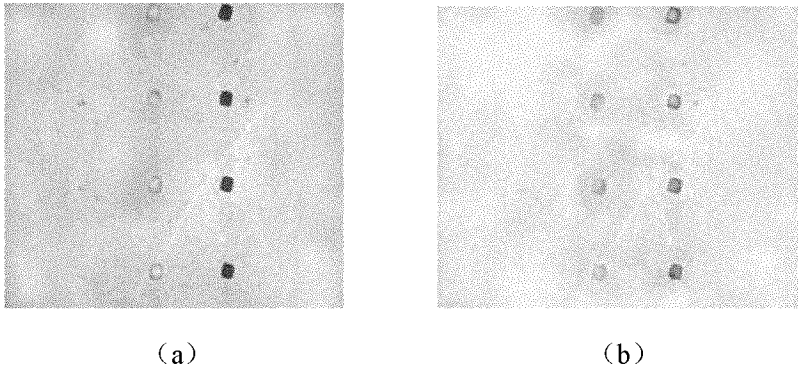


图 3

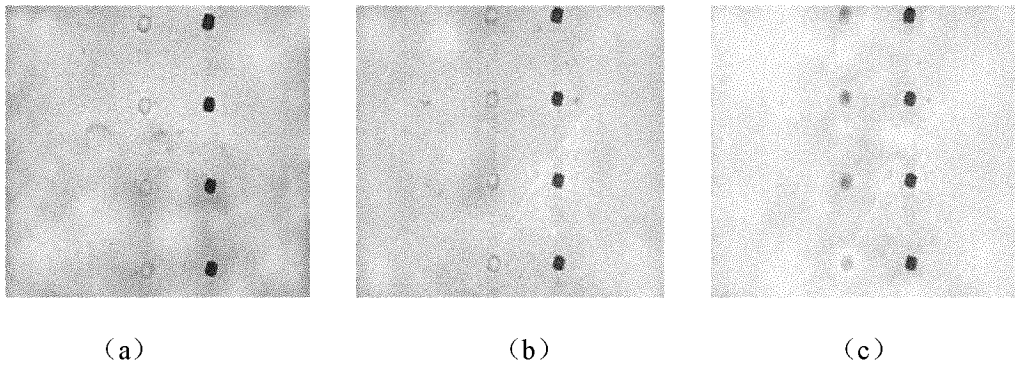


图 4

本发明涉及一种基于纳米探针的微流体芯片检测微量蛋白的方法，其特征在于采用标准的光刻工艺实现微结构的制作，用玻璃片(点有DNA探针)与微结构封接制备了所需的微流体芯片；在纳米金颗粒上同时标记单克隆二抗及信号放大作用的Barcode DNA，并在磁珠上标记单克隆一抗；在微流体芯片管道内，通过抗原抗体免疫反应以及信号的逐级放大、银染显色，从而达到对微量目标蛋白的检测。所述的方法将生物样品的富集、分离和检测连接为一体，具有特异、快速和高灵敏的特点，可望应用于临床检验医学中微量蛋白(抗原或抗体)的诊断和检测。灵敏度可达pg/ml，比临床中普通的LEISA法提高了1000倍。

